

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

23. 08. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 01 OCT 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 22 701.6

Anmeldetag:

20. Mai 2003

Anmelder/Inhaber:

Humboldt-Universität zu Berlin, 10099 Berlin/DE

Bezeichnung:Poröser Film, umfassend Metalloxidpartikel, Proben-
träger unter Verwendung des Films, Verfahren zur
Herstellung eines Probenträgers, Verwendung des
Probenträgers sowie Verfahren zum selektiven
Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopoly-
meren, insbesondere Peptiden/Proteinen**IPC:**

G 01 N 27/62

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 17. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoß

Poröser Film, umfassend Metalloxidpartikel, Probenträger unter Verwendung des Films, Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers, Verwendung des Probenträgers sowie Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, einen Probenträger unter Verwendung des Films, ein Herstellungsverfahren für den Probenträger, die Verwendung des Probenträgers sowie ein Verfahren zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Biopolymeren, insbesondere Proteinen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellfunktionen. Sie beeinflussen u. a. das Wachstum, den Metabolismus und die Genexpression. Das Erkennen des Phosphorylierungsmusters von Metabolismus und Proteomanalyse kann dazu beitragen die komplexen regulatorischen Netzwerke und Signalübertragungssysteme in einer Zelle besser zu verstehen. Die vollständige Analyse des Phosphorylierungsmusters einer biologischen Probe ist eine große Herausforderung in der Biochemie bzw. Bioanalytik, da die phosphorylierten Biopolymere, insbesondere Proteine in sehr geringen Konzentration, neben einer Vielzahl von anderen Biomolekülen vorhanden sind. Die Massenspektrometrie ist eine der wichtigsten Analysemethoden für die Charakterisierung von Biopolymeren, insbesondere Proteinen und Peptiden. Sie ist ein Analyseverfahren, um Verbindungen zu identifizieren, ihre Reinheit zu kontrollieren, die qualitative und quantitative Zusammensetzung einer Probe sowie die Masse einer Verbindung exakt zu bestimmen. Bei allen Formen der Massenspektrometrie ist die Bildung von Ionen der zu untersuchenden Spezies erforderlich, die anschließend aufgetrennt und in einem Detektor nachgewiesen werden. Demzufolge besteht jeder Massenspektrometer aus drei Bestandteilen, nämlich einer Ionenquelle, einer Vorrichtung zur Ionentrennung sowie einer Vorrichtung zum Ionennachweis. Abhängig von der Art der Ionenerzeugung unterscheidet man Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI), chemische Ionisations-Massenspektrometrie (CI), Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie (FAB), Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI) und Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI). Die Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation (MALDI), gekoppelt mit einem Massenspektrometer ist *die* Methode

zur Hochdurchsatz-Analyse von Biopolymer-, insbesondere Protein- und Peptid-Gemischen. Dabei kann es aufgrund der niedrigen Konzentration von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Proteinen/Peptiden zu einer vollständigen Signalunterdrückung in einem solchen Gemisch kommen, d. h. ein Nachweis dieser Verbindungen ist oftmals nicht möglich. Dementsprechend gibt es einen Bedarf auf dem Gebiet für ein Verfahren, zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, das für diese hochempfindlich und selektiv ist. Insbesondere existiert ein Bedarf für Vorrichtungen und Verfahren, die die Durchführung der Matrix-assistierten Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie) erleichtern und für die vorgenannten Substanzen selektiv und deutlich empfindlicher machen.

Demzufolge ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, auch in komplexen Gemischen, zu erleichtern. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren bereitzustellen, die bzw. das den Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen mittels MALDI-Massenspektrometrie erleichtert und empfindlicher macht.

Diese Aufgaben werden gelöst durch einen Probenträger zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, umfassend:

- ein Substrat,
- einen auf dem Substrat befindlichen, porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel.

Bevorzugt sind die Metalloxidpartikel ausgewählt aus der Gruppe, die Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkon-Oxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 , und Ga_2O_3).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Metalloxidpartikel Partikel aus Titandioxid, Zirkoniumdioxid und/oder Titanzirkoniumoxid, oder aus einer Mischung der vorgenannten Verbindungen.

In einer Ausführungsform hat der Film eine mittlere Porengröße < 50 nm, bevorzugt eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm, am bevorzugtesten eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm.

Es wird bevorzugt, daß der Film eine Dicke von $0,1\text{ }\mu\text{m}$ – $10\text{ }\mu\text{m}$, besonders bevorzugt eine Dicke im Bereich von 2 – $4\text{ }\mu\text{m}$, am bevorzugtesten eine Dicke von ungefähr $3\text{ }\mu\text{m}$ hat.

In einer Ausführungsform besteht das Substrat aus Glas oder beschichtetem Glas. In einer Ausführungsform ist das Glas leitfähiges Glas oder leitfähig beschichtetes Glas. In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Substrat aus mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetem Glas.

In einer Ausführungsform besteht das Substrat aus Aluminium, Aluminium mit einer Aluminiumoxid-Schicht, insbesondere eloxiertem Aluminium (elektrolytisch oxidiert).

In einer Ausführungsform umfaßt der auf dem Substrat befindliche, poröse Film weiterhin:

- eine MALDI-Matrix.

In einer Ausführungsform umfaßt die MALDI-Matrix eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon.

Unter „MALDI-Matrix“, wie hierin verwendet, ist jede Substanz zu verstehen, die sich als Matrix zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie eignet. Beispiele hierfür sind weiter unten genannt.

Unter „Biopolymeren“, wie hierin verwendet, sind insbesondere Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Lipide und Lipopolysaccharide zu verstehen.

In einer Ausführungsform liegt der auf dem Substrat befindliche Film nur an bestimmten, eigens dafür vorgesehenen Bereichen vor und deckt diese ab, während andere, dazwischen liegende Bereiche von dem Film frei bleiben.

Eine solche „Strukturierung“ kann mit Hilfe von auf dem Gebiet bekannten Verfahren erzielt werden, bspw. Siebdruckverfahren, Spin-Coating-, Dip-Coating-, Doctor-Blading-, Drop-Casting-Techniken, jeweils mit oder ohne entsprechende Lochmaske/Lochmaskenfolie, die das aufzubringende, für den Metalloxidfilm gewünschte Muster aufweist.

In einer Ausführungsform umfaßt der Probenträger weiterhin:

Eine oder mehrere auf dem Film aufgebrachte zu analysierende Proben, von denen angenommen wird, daß sie eine oder mehrere Substanzen von Interesse enthält (enthalten), wobei bevorzugt ist, daß die eine oder mehrere Probe(n) Substanzen enthält (enthalten), die ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend Nukleinsäuren und Proteine.

Am bevorzugtesten sind die Proteine phosphoryliert und/oder sulfatiert.

Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff "Substanz von Interesse" eine Substanz, deren Nachweis angestrebt wird.

Insbesondere bezeichnet der Begriff „Substanz von Interesse“ ein phosphoryliertes und/oder sulfatiertes Biopolymer.

Es ist zu betonen, daß die genaue Art und Natur des Substrats in dem erfindungsgemäßen Probenträger nicht wesentlich ist, solange gewährleistet ist, daß das Substrat zum Tragen des erfindungsgemäßen Films geeignet ist. Folglich werden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung, unabhängig von einem Probenträger, auch gelöst durch einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, wobei der Film in bevorzugten Ausführungsformen die bereits oben erwähnten Merkmale aufweist. In einer Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße Film auf einem Substrat, wie oben spezifiziert, vor.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden weiterhin gelöst durch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Films bzw. Probenträgers zum Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, wobei der Nachweis bevorzugt mittels Matrix-assistierter-Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) erfolgt.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden auch gelöst durch ein Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, umfassend die folgenden Schritte:

- Bereitstellen eines Probenträgers gemäß der vorliegenden Erfindung,
- Bereitstellen einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine, alleine oder in Kombination mit anderen Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, enthält und Aufbringen der Probe auf den Probenträger,
- Durchführen von MALDI-Massenspektrometrie.

Weiterhin werden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, wobei der Probenträger ein Substrat und einen auf dem Substrat befindlichen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, umfaßt, das Verfahren umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellung eines Sols aus Metalloxid,
- Induzieren der Gelbildung, beispielsweise durch Einengung und/oder thermische Behandlung,
- Auftragen des Gels auf ein Substrat,
- Trocknung und anschließendes Tempern bei 200 – 600°C, bevorzugt 300 – 450°C, am bevorzugtesten bei ungefähr 400°C, für einen Zeitraum von 30 Minuten – 180 Minuten, bevorzugt 30 Minuten – 60 Minuten, am bevorzugtesten für ungefähr 45 Minuten.

Bevorzugt ist das Metalloxid ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkoniumoxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid.

In einer Ausführungsform hat der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 nm – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 nm – 10 nm.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden ebenso gelöst durch einen Probenträger, herstellbar nach einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, wobei bevorzugt ist, daß der Probenträger einen porösen Film aus Metalloxidpartikeln aufweist, wobei der Film

eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 – 10 nm hat.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden außerdem gelöst durch eine Verwendung eines Probenträgers gemäß der vorliegenden Erfindung zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, wobei bevorzugt der Nachweis über MALDI-Massenspektrometrie erfolgt.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden außerdem gelöst durch ein Verfahren zum Vorbereiten einer Probe für die MALDI-Massenspektrometrie unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:

- Bereitstellen eines erfindungsgemäßen Probenträgers,
- Aufbringen einer Probe auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, wobei von der Probe angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Proteine enthält,
- einen oder mehrere Waschschrte, um den Metalloxidfilm zu waschen,
- Aufbringen eines phosphathaltigen Mediums auf den Metalloxidfilm des Probenträgers,
- Aufbringen einer MALDI-Matrix auf den Metalloxidfilm des Probenträgers.

Je nach Bedarf kann nach den einzelnen Schritten getrocknet werden. Beispiele für phosphathaltige Medien sind phosphathaltige Pufferlösungen, z.B. Natriumphosphat, Kaliumphosphat, Ammoniumphosphat bei einem geeigneten pH-Wert. Alternativ zu dem getrennten Aufbringen eines phosphathaltigen Mediums und dem Aufbringen einer MALDI-Matrix kann die MALDI-Matrix auch selbst Phosphatgruppen aufweisen. Das Waschen in dem Waschschrte/den Waschschrten kann durch Aufbringen von/Spülen mit Wasser, verdünnten Säuren, Pufferlösungen etc. erfolgen.

Unter „MALDI-Matrix“, wie hierin verwendet, ist jede Substanz zu verstehen, die sich als Matrix zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie eignet. Beispiele hierfür sind weiter unten genannt.

Die zur Anmeldung kommende Erfindung betrifft einen Probenträger bzw. ein Verfahren für den selektiven und empfindlichen Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren,

insbesondere Peptiden/Proteinen in komplexen Peptid/Protein-Gemischen mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie. Die Erfindung ermöglicht überraschenderweise eine schnelle Probenaufbereitung (ca. 30 min), kleinste Probenmengen (0,5 µl), hohe Selektivität und hohe Empfindlichkeit und ist für einen hohen Probendurchsatz geeignet. Die Erfindung beinhaltet die Herstellung von Probenträgern aus mesoporösen Metalloxidfilmen für den Nachweis von phosphorylierten und/oder sulfatierten Biomolekülen und gibt Protokolle für die Immobilisierung, Aufreinigung und Freisetzung der Biomoleküle auf dem Probenträger an. Ohne auf einen besonderen Mechanismus festgelegt sein zu wollen, gehen die Erfinder derzeit davon aus, daß die Grundlage des Verfahrens die selektive Immobilisierung der phosphorylierten/sulfatierten Biomoleküle aufgrund ihrer Affinität zu dem mesoporösen Film und der anschließenden Freisetzung und Untersuchung in einem MALDI-Massenspektrometer ist. Der Film besteht aus nanopartikulären Metalloxiden, insbesondere Titandioxid und Zirkondioxid, die mit Hilfe eines Sol-Gel-Verfahrens hergestellt werden.

Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Porengröße" auf den zwischen den im Verbund gelagerten Partikeln vorhandenen Interstitialraum und bezeichnet dessen durchschnittliche Dimensionierungen. Der Begriff "mesoporös", wie hierin verwendet, bedeutet, daß die durchschnittliche Porengröße im Bereich von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 – 10 nm liegt. Die Bezeichnung "nanopartikuläre Metalloxide" bezeichnet Metalloxide, die einen partikulären Charakter haben, wobei die durchschnittliche Partikelgröße im Bereich von 1 – 30 nm liegt.

MALDI-Probenträger werden von den führenden Massenspektrometer-Herstellern (Applied Biosystems, Waters/Micromass, BrukerDaltoniks) vertrieben. Diese Probenträger dienen zum einen dem Transport der Probe in das Massenspektrometer und/oder zur Aufreinigung bzw. Aufkonzentrieren der Probe. Eine selektive Immobilisierung von phosphorylierten/sulfatierten Biomolekülen wird mittels der kommerziell erhältlichen Probenträger nicht erreicht. Die Firma Cypherger bietet Protein Arrays auf der Basis von Metalloxiden an. Die Porengröße ist hier aber > 100 nm und daher nicht mesoporös. Es wird auch keine Selektivität bezüglich phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen beschrieben.

Ebenfalls bekannt und auch kommerziell erhältlich (Sigma/Aldrich, Pierce) ist die Immobilized Metall Affinity Chromatography (IMAC). Dabei wird das phosphorylierte Peptid selektiv mit Hilfe von Eisenkationen oder Galliumkationen gebunden und anschließend wieder freige-

setzt. Nachteilig ist hier, daß größere Probenmengen benötigt werden und die Immobilisierung "off-line", d. h. mit Hilfe einer separaten Säule/Kartusche erfolgt und anschließend die Probe auf einen MALDI-Probenträger aufgetragen wird. Dadurch kann ein Probenverlust erfolgen und die Empfindlichkeit verringert werden.

Weiterhin sind von der Gruppe um Suzuki et al. ("2D-LC for Selective Extraction of Phosphopeptides using Titania Precolumn"; Poster Abstract, 31st ASMS Conference, January 8 - 12, 2003, Montreal, Canada) Studien bekannt, in denen die Verwendung von Titandioxid als neues Packungsmaterial für die HPLC-Analyse zur selektiven Aufreinigung von phosphorylierten Verbindungen beschrieben wird. Weiterhin wird die Verwendung einer Vor-Reinigung mittels Titandioxid-HPLC in einer eigens dafür vorgesehenen Säule und der sich anschließenden Analyse mittels Massenspektrometrie dieser voraufgereinigten Probe vorgeschlagen. Der *direkte* Einsatz von Titandioxid-Filmen im Massenspektrometer wird nicht in Erwägung gezogen.

Es wird nunmehr Bezug genommen auf die Zeichnungen, bei denen

Fig. 1 beispielhaft und schematisch einen Probenträger aus ITO-Glas mit einem insulär aufgetragenen Metalloxidfilm zeigt, wobei der Durchmesser der einzelnen „Inseln“ 1 – 3 mm beträgt;

Fig. 2 den Einsatz des Probenträgers aus Fig. 1 in einen Metallträger eines MALDI-Massenspektrometers (Voyager DE) zeigt, wobei aus dem Metallträger eine Aussparung in Größe der Umrisse des Probenträgers ausgeschnitten ist.

Fig. 3 eine Photographie eines Halters für einen erfindungsgemäßen Probenträger zum Einsatz bei der MALDI-Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) zeigt,

Fig. 4 eine Photographie eines weiteren Halters für einen erfindungsgemäßen Probenträger zum Einsatz bei der MALDI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie unter Atmosphärendruck (AP/MALDI-QIT) zeigt,

Fig. 5 das Massenspektrum eines tryptischen Verdaus von Beta-Casein ohne Verwendung des erfindungsgemäßen Probenträgers zeigt, und

Fig. 6 das Massenspektrum eines tryptischen Verdaus von Beta-Casein unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers zeigt.

Die Erfindung wird nunmehr anhand der speziellen Beispiele verdeutlicht, die zu Erläuterungszwecken, nicht zur Beschränkung der Erfindung dargeboten werden.

Beispiel 1

Herstellung einer Ausführungsform eines mesoporösen Metalloxidfilms

25 ml Titanetraaisopropoxid werden mit 10 ml Isopropanol in einem Tropftrichter gemischt und langsam unter Rühren in 200 ml Wasser getropft. Anschließend werden 5 ml – 100 ml konzentrierte Salpetersäure hinzugegeben (es können jedoch auch organische Säuren, wie Essigsäure, Ameisensäure, etc. verwendet werden) und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das entstehende Isopropanol wird abgezogen. Das entstandene Sol wird dann 18 h bei 180 Grad Celsius in einem Autoklaven behandelt. Das resultierende Sol wird dann im Rotationsverdampfer bei 40°C und 30 mbar auf 15% w/w Titanoxid eingengt, mit 20 % Carbowax versetzt und 24 Stunden gerührt. Die viskose Lösung wird auf einem Substrat, z. B. Indium Zinn Oxid (ITO) beschichtetes Glas, ausgestrichen. Das Substrat wurde mit Hilfe einer Klebefolie, in der Löcher von z. B. 2 mm Durchmesser gestanzt wurden, strukturiert. Eine Strukturierung des Substrats kann mit jedem hierzu geeigneten Verfahren erfolgen. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Beispielhafte Verfahren, die verwendet werden können, und die zu einem Probenträger führen, der Bereiche mit und Bereiche ohne Metalloxidfilm hat, sind: Siebdruckverfahren, Spin-Coating-, Dip-Coating-, Doctor-Blading-, Drop-Casting-Techniken, jeweils mit oder ohne entsprechende Lochmaske/Lochmaskenfolie, die das aufzubringende, für den Metalloxidfilm gewünschte Muster aufweist.

Nach Trocknung der Lösung wird die Folie abgezogen. Anschließend wird der Glasträger bei 400°C 45 Minuten getempert. Es entstehen so mesoporöse Metalloxidfilme von 2 mm Durchmesser und 2 Mikrometer Dicke. Nach Abkühlen wird das ITO Glas in Stücke von 3 x 2 cm Größe geschnitten.

Die Anreicherung der phosphorylierten/sulfatierten Proteine/Peptide bei Auftragung der Probe erfolgt über einen erfindungsgemäßen Metalloxidfilm. Anschließend an die Aufbringung

der Probe wird mit geeigneten (unterschiedlichen) Waschlösungen, die aufgebracht und nach einer geeigneten Zeit wieder abgenommen werden, gewaschen, wobei mit den Waschlösungen zweierlei Ziele verfolgt werden, ohne daß die Erfinder an einen bestimmten Mechanismus gebunden sein wollen: 1. Auswaschen der nicht-gebundenen nicht-phosphorylierten Proteine/Peptide, 2. Lockerung der Bindung der phosphorylierten Proteine/Peptide durch Zugabe eines phosphathaltigen Puffers, wobei die im Puffer befindlichen Phosphate die gebundenen phosphorylierten Proteine/Peptide zumindest teilweise aus ihrer Bindung zu dem Metalloxidfilm lösen und dadurch dem Desorptions-Ionsisations-Vorgang zugänglich machen. Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß das Aufbringen eines phosphathaltigen Puffers auf den Metalloxidfilm die Empfindlichkeit bei der sich anschließenden Massenspektrometrie deutlich erhöht. Anschließend wird eine MALDI-übliche Matrix (bspw. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA)) aufgebracht. Alternativ zu dem getrennten Aufbringen eines phosphathaltigen Puffers und einer MALDI-Matrix kann auch eine phosphathaltige MALDI-Matrix aufgebracht werden, die sowohl als Matrix fungiert als auch den zuvor erwähnten „Phosphat-Austausch“ bewirkt. Das Einbringen des so hergestellten und probenversehenen Probenträgers in das Massenspektrometer erfolgt bspw. durch einen modifizierten Metallträger für das MALDI-TOF Voyager DE-Gerät der Firma Applied Biosystems. In den Metallträger wurde eine Aussparung in Größe des ITO Glases gefräst. Das Glas wird in die Aussparung gelegt und mit Metallzungen kontaktiert (siehe Fig. 1 und 2 für eine schematische Darstellung und Figur 3 und 4 für Photographien von tatsächlich hergestellten Probeträgern). Dabei ist in Figur 1 ein ITO-beschichtetes Glas (1) dargestellt, auf dem sich in „insulärer“ Anordnung ein Metalloxidfilm befindet, wobei die einzelnen Spots (Inseln) (2) des Metalloxidfilms durchschnittlich einen Durchmesser von 1 – 3 mm haben.

Figur 2 zeigt schematisch einen Halter (3) eines MALDI-Massenspektrometers (bspw. Voyager DE von Applied Biosystems), in den eine Aussparung (4) in Größe des ITO-beschichteten Glases aus Figur 1 gefräst worden ist. Weiterhin zeigt Figur 2 eine Metallzunge (5) zum Kontaktieren des erfindungsgemäßen Probenträgers (z.B. des ITO-beschichteten Glases aus Figur 1).

Figuren 3 und 4 zeigen einen in der Praxis hergestellten und tatsächlich verwendeten Halter für einen erfindungsgemäßen Probenträger, wobei Figur 3 einen in der Praxis für MALDI-Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) verwendeten Halter, Figur 4 einen für MALDI-Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie bei Atmosphärendruck (AP/MALDI-

QIT) verwendeten Halter zeigt. In beiden Figuren ist der insulär aufgetragene Metalloxidfilm, in Form von Kreisen, auf dem Glas zu sehen.

Beispiel 2

Um phosphorylierte Peptide mit Hilfe von MALDI-Massenspektrometrie nachzuweisen, kann beispielsweise folgendes Verfahren verwendet werden:

Idee des Verfahrens ist, daß die zu untersuchende Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte Peptide/sulfatierte Peptide enthält, auf einen erfindungsgemäßen MALDI-Probenträger (mit Metalloxidfilm) aufgebracht wird, der die phosphorylierten Peptide/Proteine selektiv anreichert, während andere, nicht-phosphorylierte/sulfatierte Proteine/Peptide durch geeignete Waschlösungen entfernt werden können. Resultat ist ein mit phosphorylierten/sulfatierten Proteinen/Peptiden angereicherter Probenträger, der danach direkt in der MALDI-Massenspektrometrie verwendet werden kann. Für die Waschschriffe nach Aufbringung der Probe können unterschiedliche Puffer verwendet werden, je nach Art, Umfang und Herkunft der aufgetragenen Probe. Anschließend wird eine MALDI-übliche Matrix aufgebracht, hierin als „MALDI-Matrix“ bezeichnet.

Beispielsweise kann folgendes Protokoll für den erfolgreichen und hochselektiven Nachweis von phosphorylierten Peptiden verwendet werden:

Protokoll für den Nachweis von phosphorylierten Peptiden

1 µl Probelösung auf einen gemäß Beispiel 1 hergestellten Film pipettieren

15 min warten

überstehende Lösung mit Pipette abnehmen

3 x mit 2 µl Wasser waschen

3 x mit 2 µl 100 mM Essigsäure waschen

1 µl 100 mM Ammoniumdihydrogenphosphat auf den Film pipettieren

15 min warten

MALDI-Matrix auf den Film pipettieren (Bspw.: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, α.-Cyano-4-hydroxyzimtsäure).

Trocknen lassen und messen mittels MALDI-Massenspektrometer.

Alternativ kann statt der getrennten Applikation eines Phosphatpuffers und einer MALDI-Matrix eine phosphathaltige/Phosphatgruppenenthaltende MALDI-Matrix auf den Film aufgetragen werden.

Beispiel 3

Fig. 5 und Fig. 6 zeigt ein Massenspektrum eines tryptischen Verdaus von Beta-Casein, erhalten ohne (Fig. 5) und mit (Fig. 4) Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers (trypt. Verdaus 15 pmol/µl, Matrix HCCA 10 mg/ml, 1 µl Probe). Die zu Phosphopeptiden (phosphorylierten Peptiden) gehörenden Peaks sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. In Fig. 5 sind die entsprechenden Peaks äußerst klein und werden deutlich überlagert von anderen Peaks von nicht-phosphorylierten Peptiden. Im Gegensatz dazu zeigt Fig. 6 die drei größten Peaks als Peaks, die auf phosphorylierten Peptiden beruhen. Dies bedeutet, daß die Verwendung eines erfindungsgemäßen Probenträgers zu einem hochselektiven und empfindlichen Nachweis von phosphorylierten Peptiden führt.

Da der Probenträger Bestandteil des MALDI-Spektrometers bzw. des dazugehörigen Verfahrens ist, entfallen aufwendige Vor-Aufreinigungsschritte in separaten Vorrichtungen, und es findet gewissermaßen eine "on-line"-Immobilisierung, Reinigung, Anreicherung und Freisetzung von phosphorylierten/sulfatierten Peptiden/Proteinen statt, was die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren für die Hochdurchsatz-Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie bestens geeignet macht.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Probenträger zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, umfassend:
 - ein Substrat,
 - einen auf dem Substrat befindlichen, porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Metalloxidpartikel ausgewählt sind aus der Gruppe, die Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkon-Oxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 und Ga_2O_3).
3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße < 50 nm hat.
4. Probenträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm hat.
5. Probenträger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.
6. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke von 0,1 μm – 10 μm hat.
7. Probenträger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke im Bereich von 2 – 4 μm hat.
8. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine Dicke von ungefähr 3 μm hat.
9. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat aus Glas oder beschichtetem Glas besteht.

10. Probenträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Glas leitfähiges Glas oder leitfähig beschichtetes Glas ist.
11. Probenträger nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat aus mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetem Glas besteht.
12. Probenträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der auf der auf dem Substrat befindliche, poröse Film weiterhin umfaßt:
- eine MALDI-Matrix.
13. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die MALDI-Matrix eine Substanz umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure, α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure, Ferulasäure, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon.
14. Probenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der auf dem Substrat befindliche Film nur an bestimmten, eigens dafür vorgesehenen Bereichen vorliegt und diese abdeckt, während andere, dazwischen liegende Bereiche von dem Film frei bleiben.
15. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 – 14, weiterhin umfassend:
Eine oder mehrere auf dem Film aufgebrachte zu analysierende Proben, von denen angenommen wird, daß sie eine oder mehrere Substanzen von Interesse enthält (enthalten).
16. Probenträger nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehrere Probe(n) Substanzen enthält (enthalten), die ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend Nukleinsäuren und Proteine.
17. Probenträger nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine phosphoryliert und/oder sulfatiert sind.

18. Verfahren zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen aus Peptid/Proteingemischen, umfassend die folgenden Schritte:

- Bereitstellen eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17,
- Bereitstellen einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine, alleine oder in Kombination mit anderen Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen, enthält und Aufbringen der Probe auf den Probenträger,
- Durchführen von MALDI-Massenspektrometrie, unter Verwendung des Probenträgers.

19. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers zur Anwendung bei der MALDI-Massenspektrometrie, wobei der Probenträger ein Substrat und einen auf dem Substrat befindlichen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, umfaßt, das Verfahren umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellung eines Sols aus Metalloxid,
- Induzieren der Gelbildung, beispielsweise durch Einengung und/oder thermische Behandlung,
- Auftragen des Gels auf ein Substrat,
- Trocknung und anschließendes Tempern bei 200 – 600°C, bevorzugt 300 – 450°C, am bevorzugtesten bei ungefähr 400°C, für einen Zeitraum von 30 Minuten – 180 Minuten, bevorzugt 30 Minuten – 60 Minuten, am bevorzugtesten für ungefähr 45 Minuten.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Metalloxid ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Nioboxid, Aluminiumtitanoxid, Wolfram-Zirkoniumoxid, Titaniumzirkoniumoxid, Hafniumdioxid, Wolframoxid, Zinndioxid, Bleioxid, Bleidioxid, Germaniumdioxid und Galliumoxid umfaßt (TiO_2 , ZrO_2 , NbO , Al_2TiO_5 , W_2ZrO_8 , TiZrO_4 , HfO_2 , WO_3 , SnO_2 , PbO , PbO_2 , GeO_2 und Ga_2O_3).

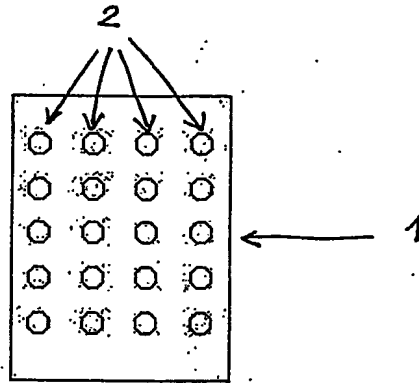
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 – 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm hat.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 25 nm hat.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Film eine mittlere Porengröße im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.
24. Probenträger, herstellbar nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 19 – 22.
25. Probenträger nach Anspruch 24, der einen porösen Film aus Metalloxidpartikeln aufweist, wobei der Film eine mittlere Porengröße von < 50 nm, bevorzugt im Bereich von 1 – 25 nm, am bevorzugtesten im Bereich von 1 nm – 10 nm hat.
26. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25 zum selektiven Nachweis von phosphorylierten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei der Nachweis über MALDI-Massenspektrometrie erfolgt.
28. Verfahren zum Vorbereiten einer Probe für die MALDI-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:
 - Bereitstellen eines Probenträgers und einem der Ansprüche 1 – 17 oder nach einem der Ansprüche 24 – 25,
 - Aufbringen, auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, einer Probe, von der angenommen wird, daß sie phosphorylierte/sulfatierte Biopolymere, insbesondere Peptide/Proteine enthält,
 - Waschen des Metalloxidfilms in einem oder mehreren Waschschritten.
 - Aufbringen, auf den Metalloxidfilm des Probenträgers, eines phosphathaltigen Mediums.
 - Aufbringen einer MALDI-Matrix auf den Metalloxidfilm des Probenträgers.
29. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 28 zur Durchführung der MALDI-Massenspektrometrie.

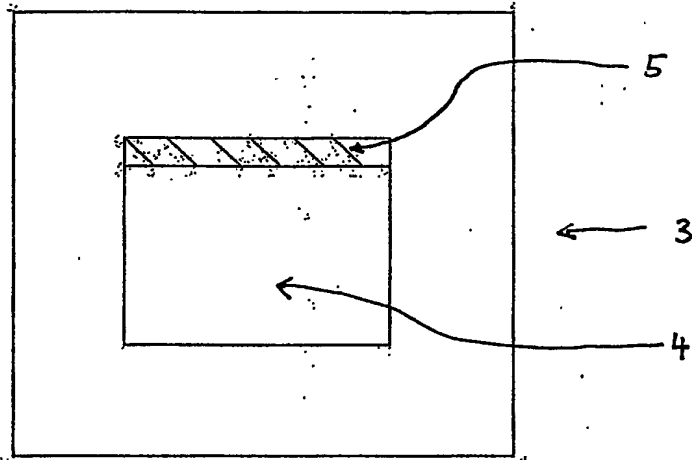
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen porösen Film, umfassend Metalloxidpartikel, einen Proben­träger unter Verwendung des Films, ein Herstellungsverfahren für den Proben­träger, die Verwendung des Proben­trägers sowie ein Verfahren zum Nachweis von phosphorylier­ten/sulfatierten Biopolymeren, insbesondere Peptiden/Proteinen.

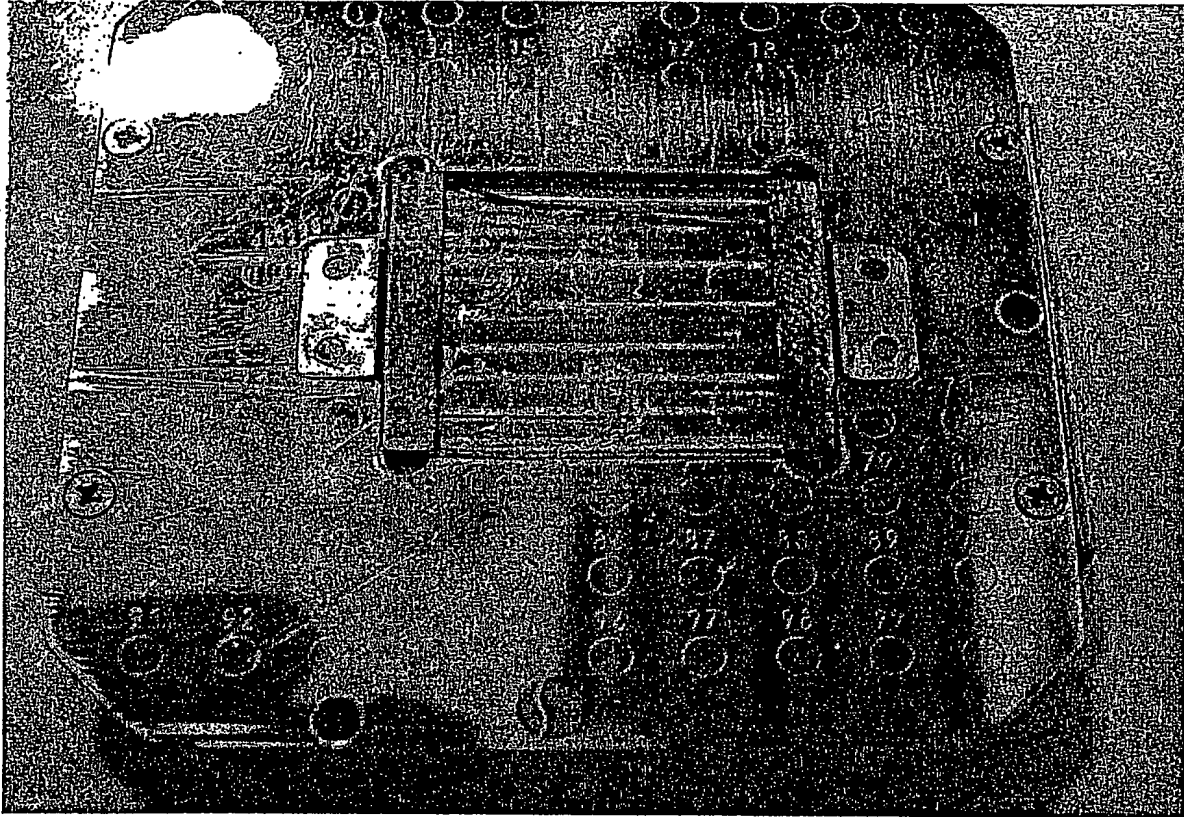
1/6



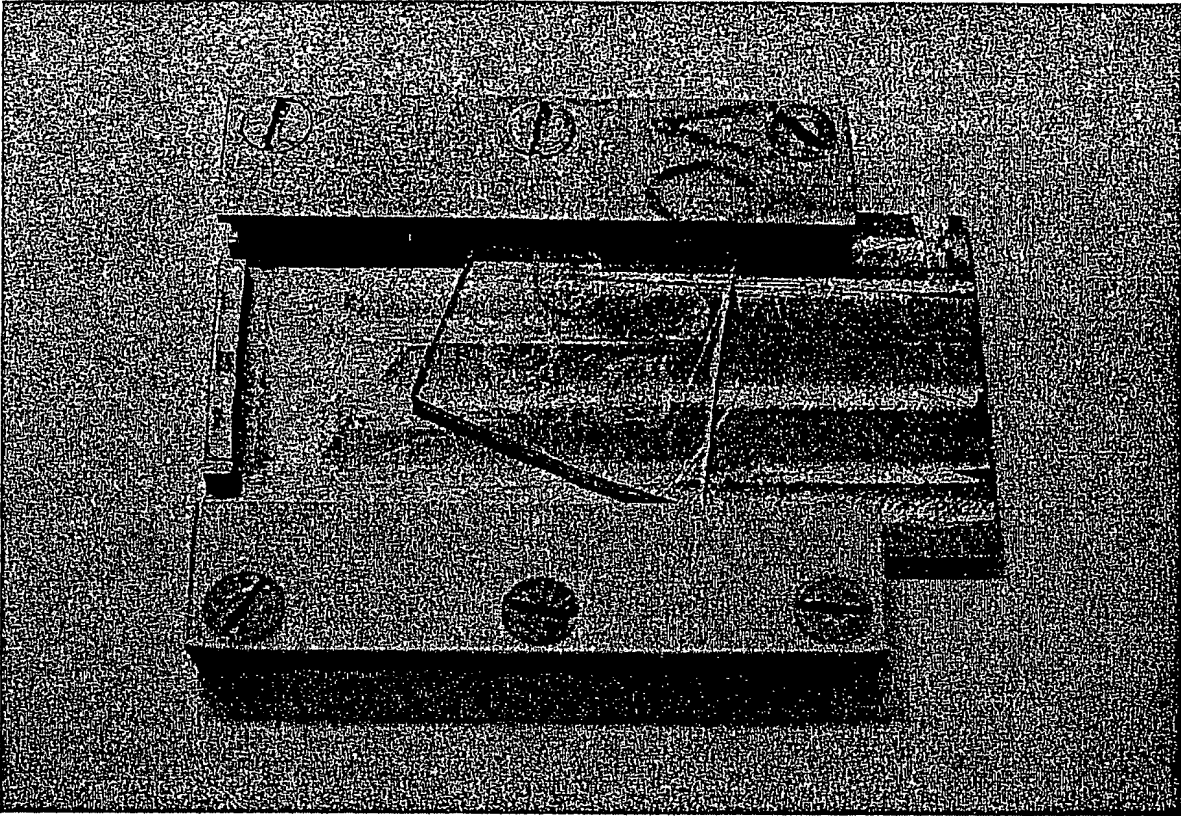
Figur 1



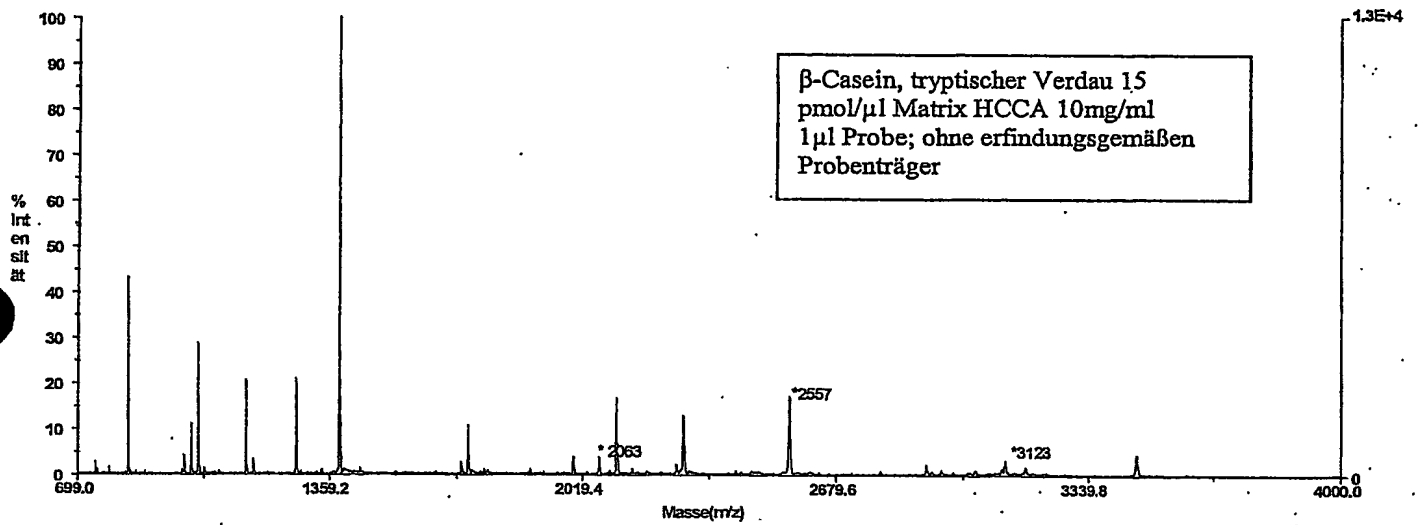
Figur 2

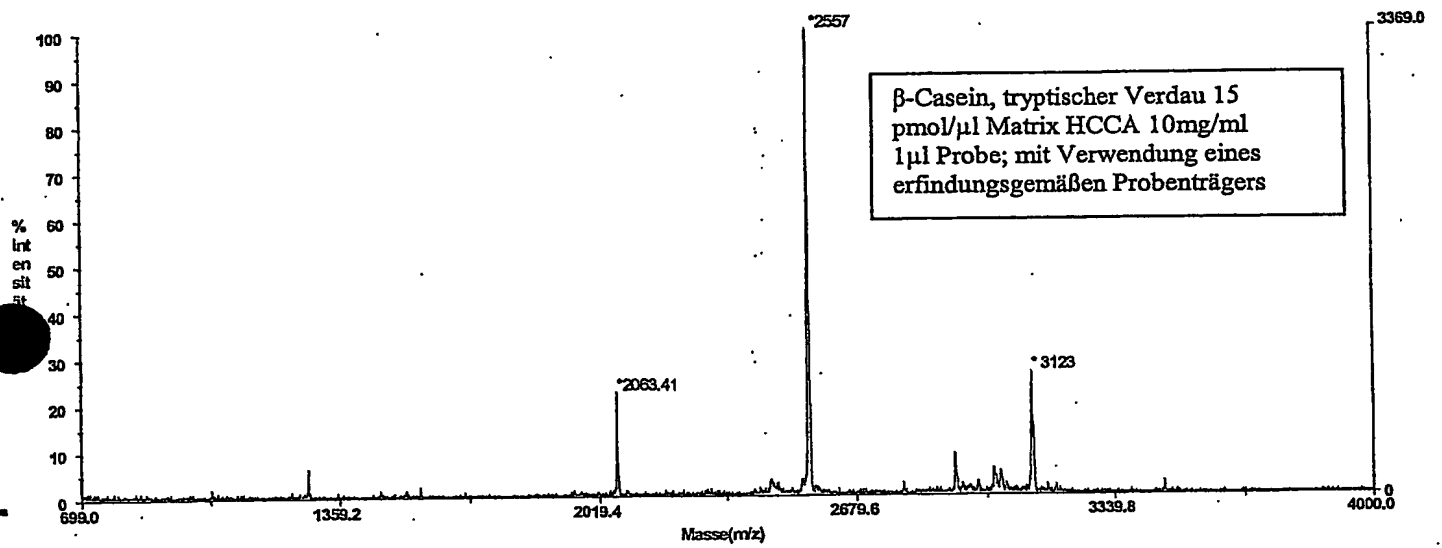


Figur 3



Figur 4

**Figur 5**

**Figur 6**